

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2000 年 12 月 14 日 (14.12.2000)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 00/75371 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/09, G01N 33/542, 33/566

C12Q 1/68,

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/03647

(22) 国際出願日: 2000 年 6 月 5 日 (05.06.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平 11/157653 1999 年 6 月 4 日 (04.06.1999) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 東ソー株式会社 (TOSOH CORPORATION) [JP/JP]; 〒746-8501 山口県新南陽市開成町 4560 番地 Yamaguchi (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 石塚哲也

(ISHIZUKA, Tetsuya) [JP/JP]; 〒227-0046 神奈川県横浜市青葉区たちばな台 2-7-3-217 Kanagawa (JP). 石黒敬彦 (ISHIGURO, Takahiko) [JP/JP]; 〒222-0034 神奈川県横浜市港北区岸根町 490-17 Kanagawa (JP). 斉藤寿一 (SAITOH, Juichi) [JP/JP]; 〒242-0028 神奈川県大和市桜森 2-20-16-101 Kanagawa (JP). 酒井智美 (SAKAI, Tomomi) [JP/JP]; 〒243-0413 神奈川県海老名市国分寺台 4-11-13 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 弁理士 小川利春, 外 (OGAWA, Toshiharu et al.); 〒101-0042 東京都千代田区神田東松山下町 38 番地 烏本鋼業ビル Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

[続葉有]

(54) Title: POTENTIATED NUCLEIC ACID AMPLIFICATION METHOD

(54) 発明の名称: 増強された核酸増幅法

(57) Abstract: A potentiated method for amplifying a specific nucleic acid which comprises, in analyzing a specific nucleic acid in a sample anticipated as containing the specific nucleic acid, using a specific RNA sequence in the sample as a template; thus forming a double-stranded DNA containing sequences complementary to and homologous with the specific RNA sequence and having a promoter sequence whereby these sequences can be transcribed; forming an RNA transcription product by using RNA polymerases; and, in an RNA amplification process wherein the RNA transcription product further serves as a template of a double-stranded DNA, adding inosine triphosphate, in addition to adenosine triphosphate, uridine triphosphate, cytidine triphosphate and guanosine triphosphate, as substrates for the RNA polymerases, thereby elevating the efficiency in the amplification reaction.

(57) 要約:

特定核酸を含むと予想される試料中の特定核酸分析において、試料中の特定 RNA 配列を鋳型として、特定 RNA 配列と相補的および相同的配列を含み、該配列を転写可能なプロモーター配列を有する 2 本鎖 DNA を生成し、RNA ポリメラーゼによって RNA 転写産物を生成し、該 RNA 転写産物が更に 2 本鎖 DNA の鋳型となる RNA 増幅工程において、RNA ポリメラーゼの基質としてアデノシン三リン酸、ウリジン三リン酸、シチジン三リン酸、グアノシン三リン酸に加え、イノシン三リン酸を添加することにより増幅反応の効率を向上させる特定核酸増幅方法。

WO 00/75371 A1



2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

増強された核酸増幅法

技術分野

本発明は、DNA や RNA 等の遺伝子混合物中に含まれると予想される、特定塩基配列を含む標的 RNA の増幅方法に関するものであり、更には、標的 RNA を増幅し、定性的又は定量的に分析する方法に関するものである。本発明は遺伝子診断等の臨床診断分野での利用に有用であり、更には、食品中、室内、土壌中、河川中、海洋中等の環境中の微生物の定性又は定量を行う際に有用である。

背景技術

一般的に、ウイルス感染症の診断では、臨床試料中の核酸（ウイルス核酸）が極微量であることが多いため、高感度かつ良好な再現性の測定を実現するために信号強度を向上し高感度化する目的で、標的核酸を増幅する方法がとられる。例えば核酸中の特定の DNA 配列を増幅する方法として、ポリメレースチェインリアクション（PCR）法が知られている。この方法は、特定の DNA 配列の両末端部に相補的なプライマー及び相同なプライマーからなる一組のプライマーと熱耐性 DNA ポリメレースを用いて、熱変性、プライマー・アニール、伸長反応からなるサイクルを繰り返し行うことにより特定の DNA 配列を増幅するものである。

特定塩基配列を含む RNA（標的 RNA）の増幅法としては、NASBA 法や 3SR 法等が知られている。この方法は、標的 RNA に対してプロモーター配列を含むプライマーと逆転写酵素及びリボヌクレエース H を用いて、プロモーター配列を含む 2 本鎖 DNA を生成し、RNA ポリメレースにより、特定塩基配列を含む RNA を生成し、以後は、該生成された RNA を前記プロモーター配列を含む 2 本鎖 DNA 合成の鋳型とする連鎖反応を生じさせるものである。

発明の開示

一般に、PCRでRNAを増幅する場合、PCRに先だってRNAを鋳型とする逆転写反応を行い、一旦cDNAを合成する、いわゆるRT-PCR法を行わなければならない、実質的に2段階の工程が要求されることとなる。またPCRは急激な昇温、降温を必要とするため、特殊なインキュベーターを必要とし、大量処理を目的とした自動化への適用が容易ではないという課題もある。

一方、前記したようなRNAの増幅法は、比較的一定温度での反応が可能であるため自動化への適用が容易である。しかし、試料中に存在する極微量の標的RNAをより高感度かつ再現性良く検出するためには、増幅効率を更に向上させる必要がある。

本発明は、更に効率が向上された、試料中の標的RNAの増幅方法を提供するものである。また本発明は、試料中の標的RNAを更に効率的に増幅しつつ、増幅されたRNAを分析する、標的RNAの分析方法である。

本発明者らは、RNAポリメラーゼを用いるRNAの増幅工程において、その基質であるリボヌクレオシド三リン酸（アデノシン三リン酸、ウリジン三リン酸、シチジン三リン酸及びグアノシン三リン酸）に加え、更にイノシン三リン酸（以下、「ITP」と略する）を特定量添加することで、増幅効率を向上し得ることを見出し本発明を完成するに至った。

本願請求項1の発明は、特定塩基配列を含む試料中の標的RNAを鋳型として、プロモーター配列を有し前記特定塩基配列又は前記特定塩基配列と相補的な配列からなるRNAを転写可能な2本鎖DNAを生成し、RNAポリメラーゼによって前記特定塩基配列又は前記特定塩基配列に相補的な配列からなるRNA転写産物を生成し、更に、該RNA転写産物を鋳型として前記2本鎖DNAを生成する工程からなるRNA増幅工程において、RNAポリメラーゼの基質としてアデノシン三リン酸、ウリジン三リン酸、

3

シチジン三リン酸、グアノシン三リン酸に加え、I T P を添加することを特徴とする標的RNAの増幅方法である。

本願請求項2の発明は、請求項1の発明に係り、RNAポリメラーゼとしてファージSP6のRNAポリメラーゼを用い、I T P を終濃度が0.5 mM～2 mMの範囲となるように添加することを特徴とする。本願請求項3の発明は、請求項2の発明に係り、添加するI T P の終濃度と、それ以外のリボヌクレオシド三リン酸（アデノシン三リン酸、ウリジン三リン酸、シチジン三リン酸及びグアノシン三リン酸）の終濃度の比率が0.5対1.0～1.5対1.0の範囲であることを特徴とする。

本願請求項4の発明は、請求項1の発明に係り、少なくとも、トリス塩酸緩衝液（pH8.5～8.9）の終濃度が20 mM～50 mM、塩化マグネシウムの終濃度が12 mM～20 mM、およびリボヌクレオシド三リン酸（アデノシン三リン酸、ウリジン三リン酸、シチジン三リン酸及びグアノシン三リン酸）の終濃度が3.5 mM～5 mM、RNAポリメラーゼとしてファージT7のRNAポリメラーゼを含み、イノシン三リン酸を終濃度が1.0 mM～2.7 mMの範囲となるように添加することを特徴とする。本願請求項5の発明は、請求項4の発明に係り、添加するI T P の終濃度と、それ以外のリボヌクレオシド三リン酸（アデノシン三リン酸、ウリジン三リン酸、シチジン三リン酸及びグアノシン三リン酸）の終濃度の比率が0.3対1.0～0.7対1.0の範囲であることを特徴とする。

本願請求項6の発明は、請求項1の発明に係り、少なくとも、トリス塩酸緩衝液（pH8.5～8.9）の終濃度が50 mM～80 mM、塩化マグネシウムの終濃度が12 mM～20 mM、リボヌクレオシド三リン酸（アデノシン三リン酸、ウリジン三リン酸、シチジン三リン酸及びグアノシン三リン酸）の終濃度が2.0 mM～3.5 mM、RNAポリメラーゼとしてファージT7のRNAポリメラーゼを含み、イノシン三リン酸を終濃度が3.

2 mM ~ 4.4 mM の範囲となるように添加することを特徴とする。本願請求項 7 の発明は、請求項 6 の発明に係り、添加する ITP の終濃度と、それ以外のリボヌクレオシド三リン酸（アデノシン三リン酸、ウリジン三リン酸、シチジン三リン酸及びグアノシン三リン酸）の終濃度の比率が 1.0 対 1.0 ~ 1.0 対 1.5 の範囲であることを特徴とする。

本願請求項 8 の発明は、請求項 1 の発明に係り、前記 RNA 増幅工程が、特定塩基配列に相補的な配列を有するプライマー及び特定塩基配列に相同的な配列を有するプライマー（ここで一方のプライマーは、5' 側に RNA ポリメラーゼのプロモーター配列を有するプロモータープライマーである）を用い、標的 RNA を鋳型として RNA 依存性 DNA ポリメラーゼにより 1 本鎖 DNA を生成し、該 1 本鎖 DNA を鋳型として DNA 依存性 DNA ポリメラーゼを用いることで、特定塩基配列又は特定塩基配列に相補的な配列からなる RNA を転写可能なプロモーター配列を有する 2 本鎖 DNA を生成すること、そして、該 2 本鎖 DNA が RNA ポリメラーゼ存在下で RNA 転写産物を生成し、該 RNA 転写産物が引き続き前記 RNA 依存性 DNA ポリメラーゼによる 1 本鎖 DNA 生成の鋳型となるものであることを特徴とする。

本願請求項 9 の発明は、請求項 1 の発明に関連し、その増幅工程をインターカレーター性蛍光色素で標識されたプローブの存在下で実施し、反応液の蛍光強度を経時的に測定することからなる標的核酸の分析方法である。そして本願請求項 10 の発明は、請求項 9 の発明に係り、前記インターカレーター性蛍光色素で標識されたプローブが、RNA 転写産物との相補結合によって、複合体を形成していない場合と比較して蛍光特性が変化するものであることを特徴とする。

図面の簡単な説明

図 1 は実施例 1 ~ 4 で用いたインターカレーター性蛍光色素で標識され

たオリゴヌクレオチドのインターカレーター性蛍光色素部分の化学構造である。B₁～B₃は核酸塩基を示す。

図2は実施例1で行った初期RNA量10⁶コピー／30μlにおいて、ITPの終濃度を0.1mM～1.0mMとした際の反応時間と蛍光強度比のグラフである。Neg aとはRNA試料の代わりに希釈液のみを用いたサンプルのことである。

図3は実施例1で行った初期RNA量10⁴コピー／30μlにおいて、ITPの濃度を1.0～2.0mMとした際の反応時間と蛍光増加率のグラフである。Neg aはRNA試料の代わりに希釈液のみを用いた。

図4は実施例2で行った初期RNA量10⁶コピー／30μlにおいて、ITPの濃度を0.5mM～3.0mMとした際の反応時間と蛍光増加率のグラフである。Neg aとはRNA試料の代わりに希釈液のみを用いたサンプルのことである。

図5は実施例3で行った、2種類のRNA試料（HCVとWQ）のそれぞれに相補的な、蛍光性色素で標識したオリゴヌクレオチド（YO-271とYO-WT）による特異産物の検出の反応時間と蛍光強度比のグラフである。初期RNA量は10⁵コピー／30μlで実施した。表中のNeg aとはRNA試料の代わりに希釈液を用いたサンプルのことを表している。特異的な組み合わせ（HCVとYO-271、WQとYO-WT）のみ蛍光増加が見られた。

図6は実施例3で反応させた後のサンプルの4%アガロースゲル電気泳動の結果を示す、階調反転写真である。RNA試料が存在していたサンプル（レーン1、2、4、5）では特異的なバンドが検出された。レーン7、8はHCV-RNA（155bp）とWQ-RNA（102bp）の標品である。分子量マーカーにはφX174／HaeIIIを使用した。

図7は実施例4で行った初期RNA量10⁵コピー／30μlにおいて、

I T P の終濃度を 2.8 mM ~ 4.4 mM とした際の反応時間と蛍光増加率のグラフである。N e g a とは R N A 試料の代わりに希釈液のみを用いたサンプルのことである。

図 8 は実施例 4 で行った初期 R N A 量 10^5 コピー / $30 \mu\text{l}$ において、I T P の終濃度を 2.8 mM ~ 4.4 mM とした際の立上り時間（蛍光強度比：N e g a とは R N A 試料の代わりに希釈液のみを用いたサンプルのことである。

発明を実施するための最良の形態

本発明は、R N A ポリメラーゼが D N A を鋳型として R N A を生成する際に、I T P が存在すると R N A 生成効率が向上するという知見に基づくものである。

本発明は、例えば以下 (A) ~ (I) の試薬を用意し、標的 R N A を含むと予想される試料にこれらを順次添加するか、これらの 2 以上を一度に添加するか、又はこれらを一度に添加する操作により実施することが可能である（(A) ~ (I) は、この順に添加することを要しない）。

(A) 前記 1 本鎖 R N A 中の特定塩基配列の 3' 側末端配列に相補的な配列を有する第 1 の 1 本鎖オリゴヌクレオチド、

(B) R N A 依存性 D N A ポリメラーゼ、

(C) デオキシリボヌクレオシド三リン酸

(D) リボヌクレエース H または同等の R N A 分解活性を有する酵素、

(E) 5' 末端側から順に (1) D N A 依存性 R N A ポリメラーゼのプロモーター配列、(2) 該プロモーターのエンハンサー配列及び (3) 前記 1 本鎖 R N A 中の特定塩基配列の 5' 末端配列と同一の塩基配列を有する第 2 の 1 本鎖オリゴヌクレオチド、

(F) D N A 依存性 D N A ポリメラーゼ、

(G) D N A 依存性 R N A ポリメラーゼ、

(H) リボヌクレオシド三リン酸 (アデノシン三リン酸、ウリジン三リン酸、シチジン三リン酸、グアノシン三リン酸)、

(I) ITP。

また例えば、また、上記試薬 (A) 及び試薬 (E) の、第 1 及び第 2 の 1 本鎖オリゴヌクレオチドの組み合わせを用いる以外に、以下の試薬 (J) 及び試薬 (K) の第 1 及び第 2 の 1 本鎖オリゴヌクレオチドの組み合わせを用いてもよい。

(J) 5' 末端側から順に (1) DNA 依存性 RNA ポリメラーゼのプロモーター配列、(2) 該プロモーターのエンハンサー配列及び (3) 標的 RNA 中の特定塩基配列の 3' 側末端配列に相補的な配列を有する第 1 の 1 本鎖オリゴヌクレオチド、

(K) 標的 RNA 中の特定塩基配列の 5' 側末端配列と同一の塩基配列を有する第 2 の 1 本鎖オリゴヌクレオチド。

上記において特定塩基配列とは、上記 (A) および (E) の第 1 及び第 2 の 1 本鎖オリゴヌクレオチドを使用した場合、5' 末端が (E) の第 2 の 1 本鎖オリゴヌクレオチドにおける (3) の配列で始まり、3' 末端が (A) の第 1 の 1 本鎖オリゴヌクレオチドと相補的な配列で終わる、標的 RNA 中に存在する塩基配列部分である。また上記 (J) 及び (K) の第 1 及び第 2 の 1 本鎖オリゴヌクレオチドを使用した場合には、5' 末端が (K) の第 2 の 1 本鎖オリゴヌクレオチドと同一な配列で始まり、3' 末端が (J) の第 1 の 1 本鎖オリゴヌクレオチドにおける (3) の配列に相補的な配列で終わる、標的 RNA 中に存在する塩基配列部分である。特定塩基配列は任意に決定することができるが、標的 RNA を他の核酸から区別し得る程度に特異的な配列部分を含むようにすることが重要である。

試薬 (A) は、特定塩基配列の 3' 末端に相補的な配列を有する第 1 の 1 本鎖オリゴヌクレオチドである。該試薬は標的 RNA に相補結合し、後

述する試薬（B）及び（C）の共存下で、RNA依存性DNAポリメラーゼによる標的RNAを鋳型とするcDNA合成が行われる際に、該cDNAの5'側末端に特定塩基配列の3'末端と相補的な配列が位置するようにするためのものである。

試薬（B）はRNA依存性DNAポリメラーゼであり、試薬（C）はその基質となるデオキシリボヌクレオシド三リン酸である。試薬（A）～（C）の共存下で、標的RNA中の特定塩基配列の3'末端に相補的な配列を5'末端に持つcDNAが合成される。このcDNAは、鋳型となったRNAと、DNA-RNA 2本鎖を形成した状態である。

試薬（D）は、上記DNA-RNA 2本鎖中のRNAを切断する活性を有するリボヌクレアーゼHであるが、同等のRNA分解活性を有する酵素を用いることもできる。トリ筋芽細胞腫ウイルス逆転写酵素（以下、AMV逆転写酵素）に代表される逆転写酵素は、DNA-RNA 2本鎖中のRNAを切断する活性を有しており、この種の酵素を用いることが例示できる。

試薬（E）は、5'末端側から順に（1）DNA依存性RNAポリメラーゼのプロモーター配列、（2）該プロモーターのエンハンサー配列及び（3）特定塩基配列の5'末端配列と同一の塩基配列を有する第2の1本鎖オリゴヌクレオチドである。第2のオリゴヌクレオチドにおいて、（3）の部分は試薬（A）～（D）が共存することで合成されるcDNAの3'末端に結合する。従って試薬（C）と（F）の共存により、第2のオリゴヌクレオチドの3'末端から該cDNAを鋳型として、また同時に該cDNAの3'末端から該第2のオリゴヌクレオチドを鋳型として、DNA依存性DNAポリメラーゼによりそれぞれの相補鎖が合成され、転写可能なプロモーター配列を有する完全な2本鎖DNAが合成される。

試薬（F）はDNA依存性DNAポリメラーゼである。AMV逆転写酵

素に代表される逆転写酵素には、DNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有するものがあり、この種の酵素を用いてもよい。

試薬（G）は、DNA依存性RNAポリメラーゼであり、試薬（H）と（I）はその基質となるリボヌクレオシド三リン酸及びITPである。試薬（C）、（E）及び（F）の共存により合成される2本鎖DNAは、DNA依存性RNAポリメラーゼのプロモーター領域を末端に有する。このため、試薬（G）及び（H）の共存下では該DNA合成後、直ちに特定塩基配列からなる1本鎖RNAの合成が開始される。ここで、前述の通り、試薬（I）を共存させることにより該RNAの合成量を飛躍的に増大することができる。試薬（G）におけるDNA依存性RNAポリメラーゼとしては、具体的に例えばT7 RNAポリメラーゼやT3 RNAポリメラーゼ、SP6 RNAポリメラーゼ等を例示することができる。

試薬（G）～（I）の共存により合成される1本鎖RNAは特定塩基配列からなるRNAである（一部ITPに置換されている）。従って、これらが合成されて試薬（A）～（F）と共存することにより、上述した一連の反応が繰り返し生じることとなる。このように、本発明では試料中に存在する極微量の標的RNAをもとにして前記の如きプロモーター領域を末端にもつ2本鎖DNAが合成され、これが特定塩基配列からなる1本鎖RNAの合成源となる。合成された1本鎖RNAは新たな2本鎖DNAの合成に寄与し、結果として時間の経過とともに特定塩基配列からなる1本鎖RNA量は飛躍的に増大する。

本発明の分析方法は、例えば前記のようなRNAの増幅工程において、試薬（L）を添加し、反応液の蛍光強度を測定する工程を含む、標的RNAの分析方法である。

（L）前記特定塩基配列に相補的な配列を有し、該配列を有する核酸と結合した場合に測定可能な蛍光信号を発するように標識された第3の一本

鎖オリゴヌクレオチド。

この第3のオリゴヌクレオチドは、例えばインターカレーター性蛍光色素が結合されたDNAであれば良い。該DNA部分は、特定塩基配列の特異的分析のため、6～100ヌクレオチド、更に好ましくは10～30ヌクレオチドとすることが好ましい。むしろ該DNA部分は、特定塩基配列中に存在する配列であって、標的核酸以外の核酸と十分に区別可能な配列部分と相補的な配列であることが重要である。また、DNA部分は合成された特定塩基配列からなる1本鎖RNAと相補結合を形成した場合に、既に添加されている試薬(C)におけるRNA依存性DNAポリメラーゼが作用してその3'末端からの伸長が生じないように、該3'末端が特定塩基配列と非相補的な配列が付加されているか、または、その3'末端が化学的に修飾されていることが好ましい。

インターカレーター性蛍光色素は、DNA部分が他の核酸と相補結合を形成すると2本鎖部分にインターカレーションして蛍光特性が変化するものである。この目的のためには、インターカレーター性蛍光色素を、2本鎖部分へのインターカレーションを妨げない程度の適当な分子長リンカーを介してDNAと結合することが例示できる。かかるリンカーとしては、インターカレーター性蛍光色素が2本鎖部分にインターカレーションすることを妨げない分子であれば特に制限はない。特に両末端に官能基を有する二官能性炭化水素から選択されるリンカー分子は、オリゴヌクレオチドへの修飾を行う上で簡便で好ましい。また、例えば、市販の試薬セット(C6-Thiol modifier, 商品名、Clontech製)等を使用することもできる。

インターカレーター性蛍光色素としては、2本鎖にインターカレーションすることで、例えば発する蛍光波長が変動したりする等、その蛍光特性が変化するものであれば特に制限はないが、測定の容易さ等の観点からイ

ンターカレーションにより蛍光強度が増加する性質を有するものが特に好ましい。より具体的には特に蛍光強度の変化が著しいチアゾールオレンジ、オキサゾールイエロー又はそれらの誘導体を特に好ましいインターカレーター性蛍光色素として例示できる。

インターカレーター性蛍光色素をリンカーを介してDNAに結合させる位置は、DNAの5'末端、3'末端又は中央部等、インターカレーター性蛍光色素の2本鎖へのインターカレーションが妨げられず、かつ、DNA部分とRNAとの相補結合を阻害しない限り特に制限はない。

プロモーター配列を有する2本鎖DNAを鋳型として試薬(G)～(I)により合成される1本鎖RNA量は経時的に増加する。そこで、試薬(L)を、上記標的RNAを含むと予想される試料に、少なくとも試薬(A)～(I)とともに共存させ、増加する特定塩基配列からなる1本鎖RNAを、蛍光信号として測定する。ここで、合成された1本鎖RNAと試薬(L)の第3のオリゴヌクレオチドが相補結合を形成し、蛍光信号を発した場合であっても、このRNAは試薬(A)～(C)共存下でのDNA合成における鋳型として機能することが明らかとなった。即ち本発明では、各試薬の共存状態においてRNAからのcDNA合成、2本鎖DNAの合成、2本鎖DNAからのRNA合成という一連の現象が、第3のオリゴヌクレオチド共存下で生じ、RNAの増加に比例して蛍光強度が増加する。

本発明で、上記試薬(A)及び(E)に代えて試薬(J)及び(K)を用いるのであれば、前記試薬(L)に代えて以下の(M)を用いることにより、特定核酸を分析することが可能である。

(M) 標的RNA中の特定塩基配列に同一な配列を有し、該配列と相補的配列を有する核酸と結合した場合に測定可能な蛍光信号を発するように標識された第3の1本鎖オリゴヌクレオチド。

試薬(J)は、5'側末端から順に(1)DNA依存性RNAポリメレ

ースのプロモーター配列、(2) 該プロモーターのエンハンサー配列及び
(3) 前記1本鎖RNA中の特定塩基配列の3'側末端配列に相補的な配列を有する第1の1本鎖オリゴヌクレオチドである。該試薬の(3)の部分は特定塩基配列中の3'側末端に相補結合し、試薬(A)を用いた場合と同様に、試薬(B)および(C)および(D)の存在下で、標的RNAに相補的なcDNAが合成される。試薬(K)は、該cDNAの特定塩基配列中の5'側末端に相補的配列を有する1本鎖オリゴヌクレオチドである。該試薬(K)は、該cDNAの特定塩基配列中の5'側末端に相補的結合をした後、試薬(C)および試薬(F)の共存により、RNAポリメラーゼのプロモーター配列を有する2本鎖DNAが合成される。更に該2本鎖DNAは、試薬(G)～(H)の共存により、特定塩基配列に相補的な第2の1本鎖RNAが合成される。更に試薬(I)を共存させることにより、該1本鎖RNAの合成量は飛躍的に増大する。

更に、該第2のRNAの3'側末端は試薬(K)と相補結合し、試薬(B)～(D)の共存下で、該第2のRNAの第2のcDNAが合成される。該第2のcDNAは試薬(J)の(3)部分と相補結合し、試薬(C)および試薬(F)によりプロモーター配列を含有する2本鎖DNAが合成され、試薬(G)～(I)により該第2のRNAが合成される。合成された特定塩基配列に相補的な該第2のRNAは、新たな2本鎖DNAの合成源となり、一連の反応が繰り返し生じることにより、結果として該第2のRNAの量は飛躍的に増大する。

ここで得られた該第2のRNAは、標的RNA中の特定塩基配列と相補的な配列を有する。特定塩基配列と同一な配列を有し、かつインターカレーター性蛍光色素で標識された第3の1本鎖オリゴヌクレオチドである試薬(M)を共存させることにより、合成された該第2のRNA量に比例して蛍光強度が増加する。

本願発明における蛍光信号の測定は、好ましくは試薬（A）～（I）および試薬（L）または試薬（M）の添加直後から、又は、添加後所定時間経過後から経時的に行う。試薬試薬（L）又は試薬（M）の第3のDNAは、1本鎖RNAの合成過程において、合成されたRNAと結合・解離を繰り返すが、結合時に測定される蛍光信号は各測定時における該RNAの存在量を反映するため、1本鎖RNAの増加する様子を経時的に追跡することが可能である。なお、測定自体は連続的なものであっても一定時間毎の間欠的なものであっても良い。また、蛍光信号の測定装置は、本願発明の一部を構成しないが、1本以上の反応管中の蛍光信号を連続的または一定時間毎の間欠的に測定できるものであれば如何なる装置を用いても良い。

蛍光信号の測定時間は、一定量の標的RNAを含んだ試験区の蛍光強度が増加する時間が標的RNAを含まない試験区と有為に差の見られる時間を含み、一定量の標的RNAを含んだ試験区の蛍光強度がほぼ一定になるまでの時間で、概ね4時間、好適条件では1時間である。

以下、本発明を実施例により更に詳細に説明するが、本発明はこれら実施例により限定されるものではない。

実施例 1

標的核酸増幅におけるITP添加（終濃度0.1mM～2.0mM）の効果を検討した。

（1）ヒトC型肝炎ウイルスRNAの塩基番号113～267（加藤ら、Proc. Natl. Sci., USA、1990年、87、9524～9528）を標準RNA試料とし、260nmの紫外部吸収により定量後、RNA希釈液（10mM Tris-HCl（pH8.0）、0.1mM EDTA、0.5U/μl RNase Inhibitor）を用い 10^6 、 10^4 コピー/4μlとなるよう希釈した。コントロール試験区（Neg a）には、前記RNA希釈液のみを用いた。

(2) 以下の組成の反応液 15.2 μ l を市販の 0.5 ml 容 PCR 用チューブ (商品名; Gene Amp Thin-Walled Reaction Tubes、パーキンエルマー社製) に分注し、これに上記 RNA 試料 4 μ l を添加後、ミネラルオイル 100 μ l を重層した。

反応液の組成

- 59.2 mM Tris-酢酸緩衝液 (pH8.1)
- 13.2 mM 酢酸マグネシウム
- 123.7 mM 酢酸カリウム
- 15.8% ソルビトール
- 19.7 mM DTT
- 各 1.0 mM の dATP、dCTP、dGTP、dTTP
- 各 2.0 mM の ATP、CTP、GTP、UTP
- 各種濃度 (0.2 mM、1.0 mM、2.0 mM、3.0 mM、4.0 mM) の ITP
- 0.4 μ M の第 1 のオリゴヌクレオチド (配列番号 1)
- 0.4 μ M の SP6 プロモーター配列を有する第 2 のオリゴヌクレオチド (配列番号 2; 該配列中の 5' 端 1 番目の「A」から 17 番目の「A」までの部分は SP6 プロモーター配列であり、また 18 番目の「G」から 25 番目の「A」までの部分はエンハンサー配列である)
- 0.049 μ M のインターカレーター性蛍光色素 (図 1) で標識された第 3 のオリゴヌクレオチド (配列番号 3; 該配列中の 5' 端から 5 番目の「C」と 6 番目の「G」の間にインターカレーター性蛍光色素が標識されており、またその 3' 末端はグリコール酸で修飾されている、以後、YO-271 と略する)
- 60 ユニット リボヌクレエース インヒビター (宝酒造 (株) 製)
- 3.9% DMSO

容量調製用蒸留水

(3) 上記の反応液を、50℃で5分間保温後、以下の組成の酵素液10.8μlを添加した。

酵素液の組成

83.3mM Tris-酢酸緩衝液 (pH 8.1)

18.5mM 酢酸マグネシウム

174.1mM 酢酸カリウム

22.2% ソルビトール

42ユニット AMV逆転写酵素 (宝酒造(株)製)

171ユニット SP6 RNAポリメラーゼ (宝酒造(株)製)

3μg 牛血清アルブミン

容量調製用蒸留水

(4) 引き続きPCRチューブを直接測定可能な温調機能付蛍光分光光度計を用い、50℃に保温して、励起波長490nm、蛍光波長510nmで、PCRチューブ内の反応溶液の蛍光強度を5分間隔で測定した。

酵素液添加時の時刻を0分として、サンプルの蛍光強度比(所定時刻の蛍光強度値÷バックグラウンドの蛍光強度値)の経時変化を図2(RNAサンプル濃度 10^6 コピー/テスト、ITP終濃度0.1mM~1.0mM)、図3(RNAサンプル濃度 10^4 コピー/テスト、ITP終濃度1.0mM~2.0mM)に示した。

これらのことから、RNAポリメラーゼとしてSP6 RNAポリメラーゼを用いた場合、終濃度が0.5mM~2mMとなるITPを反応系内に添加することによって特定核酸の増幅効率は飛躍的に向上することが示された。また、陰性(Nega)のときには蛍光強度の増加が見られていないことから、蛍光強度の増加は特定塩基配列の増加を反映していることが示された。

実施例 2

標的核酸増幅における I T P 添加（終濃度 0.5 mM ~ 3.0 mM）の効果を検討した。

（1）前記ヒト C 型肝炎ウイルス RNA を標準 RNA 試料とし、260 nm の紫外部吸収により定量後、RNA 希釈液（10 mM Tris-HCl（pH 8.0）、0.1 mM EDTA、0.5 U/μl RNase Inhibitor）を用い 10^6 コピー/2.5 μl となるよう希釈した。コントロール試験区（Neg a）には、希釈液のみを用いた。

（2）以下の組成の反応液 21.0 μl を市販の 0.5 ml 容 PCR 用チューブ（商品名；Gene Amp Thin-Walled Reaction Tubes、パーキンエルマー社製）に分注し、これに上記 RNA 試料 2.5 μl を添加後、ミネラルオイル 100 μl を重層した。

反応液の組成

47.6 mM Tris-塩酸緩衝液（pH 8.5）

17.1 mM 塩化マグネシウム

185.7 mM 塩化カリウム

1.4 mM DTT

各 0.7 mM の dATP、dCTP、dGTP、dTTP

各 5.4 mM の ATP、CTP、GTP、UTP

0.7、1.4、2.1、2.9、3.6、3.9 又は 4.3 mM の I T P

1.1 μM の第 1 のオリゴヌクレオチド（配列番号 4）

1.1 μM の T7 プロモータ配列を有する第 2 のオリゴヌクレオチド（配列番号 5；該配列中の 5' 端 1 番目の「A」から 22 番目の「A」までの部分は T7 プロモータ配列であり、また 23 番目の「G」から 28 番目の「A」までの部分はエンハンサー配列である）

0.049 μ Mのインターカレーター性蛍光色素（図1）で標識された第3のオリゴヌクレオチド（配列番号6；該配列中の5'端14番目の「A」と15番目の「C」の間にインターカレーター性蛍光色素が標識されており、またその3'末端はグリコール酸で修飾されている、以後Y O-H C 1 bと略する）

40ユニット リボヌクレエース インヒビター（宝酒造（株）製）

21.4% DMSO

容量調製用蒸留水

（3）上記の反応液を、41℃で5分間保温後、以下の組成の酵素液6.5 μ lを添加した。

酵素液の組成

30.8mM Tris-塩酸緩衝液（pH8.5）

7.8% ソルビトール

29ユニット AMV逆転写酵素（宝酒造（株）製）

142ユニット T7 RNAポリメラーゼ（東洋紡（株）製）

3 μ g 牛血清アルブミン

容量調製用蒸留水

（4）引き続きPCRチューブを直接測定可能な温調機能付蛍光分光光度計を用い、41℃に保温して、励起波長490nm、蛍光波長510nmで、PCRチューブ内の反応溶液の蛍光強度を5分間隔で測定した。

酵素液添加時の時刻を0分として、サンプルの蛍光強度比（所定時刻の蛍光強度値÷バックグラウンドの蛍光強度値）の経時変化を図4（RNAサンプル濃度 10^6 コピー／テスト、ITP終濃度0.5mM～3.0mM）に示した。

これより、T7 RNAポリメラーゼを用いた場合、ITPを終濃度が0.5mMとなるように添加した場合より1.0mM～2.7mMとなる

ように添加した場合の方が特定核酸の増幅効率は飛躍的に向上することが示された。また、陰性 (N e g a) の場合には蛍光強度の増加が見られていないことから、特定塩基配列のRNAを検出していることが示された。

実施例3

インターカレーター性蛍光色素 (図1) で標識された第3のオリゴヌクレオチドおよび第4のオリゴヌクレオチドによる特異産物の検出を検討した。

(1) 前記標準RNA (HCV-RNA) と合成RNA (WQ-RNA、配列番号7) を、RNA希釈液 (10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.1 mM EDTA、0.5 U/ μ l RNase Inhibitor) を用い、 10^5 コピー/ 4μ l となるよう希釈した。コントロール試験区 (N e g a) には、希釈液のみを用いた。

(2) 以下のRNAサンプル、インターカレーター性蛍光色素 (図1) で標識されたオリゴヌクレオチドの組み合わせになるように (3) で溶液を調整した。

RNAサンプル	蛍光色素標識オリゴヌクレオチド
① HCV RNA	第3オリゴヌクレオチド (YO-271)
② WQ-RNA	第3オリゴヌクレオチド (YO-271)
③ N e g a	第3オリゴヌクレオチド (YO-271)
④ WQ-RNA	第4オリゴヌクレオチド (YO-WT)
⑤ HCV RNA	第4オリゴヌクレオチド (YO-WT)
⑥ N e g a	第4オリゴヌクレオチド (YO-WT)

(3) 以下の組成の反応液 15.2μ l を市販の 0.5 ml 容PCR用チューブ (商品名; Gene Amp Thin-Walled Reaction Tubes、パーキンエルマー社製) に分注し、これに上記RNA試料 4μ l を添加後、ミネラルオイル 100μ l を重層した。

反応液の組成

59. 2 mM Tris-酢酸緩衝液 (pH 8.1)

13. 2 mM 酢酸マグネシウム

123. 7 mM 酢酸カリウム

15. 8% ソルビトール

19. 7 mM DTT

各 1. 0 mM の dATP、dCTP、dGTP、dTTP

各 2. 0 mM の ATP、CTP、GTP、UTP

2. 5 mM の ITP

0. 4 μ M の第 1 のオリゴヌクレオチド (配列番号 1)

0. 4 μ M の SP6 プロモータ配列を有する第 2 のオリゴヌクレオチド (配列番号 2)

0. 049 μ M のインターカレーター性蛍光色素 (図 1) で標識された第 3 のオリゴヌクレオチド (YO-271) 又はインターカレーター性蛍光色素 (図 1) で標識された、YO-271 とは異なる第 4 のオリゴヌクレオチド (配列番号 8 ; 該配列中の 5' 端 10 番目の「A」と 11 番目の「G」の間にインターカレーター性蛍光色素が標識されており、その 3' 末端はグリコール酸で修飾されている、以後 YO-WT と略する)

60 ユニット リボヌクレエース インヒビター

3. 9% DMSO

容量調製用蒸留水

(4) 上記の反応液を、50℃で5分間保温後、以下の組成の酵素液 10. 8 μ l を添加した。

酵素液の組成

83. 3 mM Tris-酢酸緩衝液 (pH 8.1)

18. 5 mM 酢酸マグネシウム

174. 1 mM 酢酸カリウム

22. 2% ソルビトール

42 ユニット AMV 逆転写酵素 (宝酒造 (株) 製)

171 ユニット SP6 RNA ポリメラーゼ (宝酒造 (株) 製)

3 μ g 牛血清アルブミン

容量調製用蒸留水

(5) 引き続き PCR チューブを直接測定可能な温調機能付蛍光分光光度計を用い、50℃に保温して、励起波長 490 nm、蛍光波長 510 nm で、PCR チューブ内の反応溶液の蛍光強度を 5 分間隔で測定した。

酵素液添加時の時刻を 0 分として、各サンプルの蛍光強度比 (所定時刻の蛍光強度値 ÷ バックグラウンドの蛍光強度値) の経時変化を求めた結果を図 5 に、増幅後のサンプルの 4% アガロース電気泳動の結果を図 6 に示した。図 5 より標的 RNA と、その相補的な蛍光色素で標識したオリゴヌクレオチド (HCV と YO-271、WQ と YO-WT) を用いた時のみ、蛍光増加が観測された。図 6 より、RNA 試料が存在していたサンプル (レーン 1、2、4、5) は特異的なバンドが検出された。以上のことより、ITP 添加した際にも、得られた蛍光強度は特異的産物の増幅のみを反映していることが示された。

実施例 4

実施例 2 の反応条件を更に最適化した条件において、標的核酸増幅における添加 ITP 濃度 (終濃度 2.8 mM ~ 4.4 mM) の最適値を検討した。

(1) ヒト C 型肝炎ウイルス RNA の塩基番号 1 ~ 1487 (加藤ら、Proc. Natl. Sci., USA、1990 年、87、9524 ~ 9528) を含む全長 1549 mer のリコンビナントの RNA を標準 RNA 試料とし、260 nm の紫外吸収により定量後、RNA 希釈液 (10

mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.1 mM EDTA、0.5 U/ μ l RNase Inhibitor、5.0 mM DTT) を用い 10^5 コピー/ 5μ l となるよう希釈した。コントロール試験区 (Negative) には、前記 RNA 希釈液のみを用いた。

(2) 以下の組成の反応液 20.8μ l を市販の 0.5 ml 容 PCR 用チューブ (商品名; Gene Amp Thin-Walled Reaction Tubes、パーキンエルマー社製) に分注し、これに上記 RNA 試料 5μ l を添加した。

反応液の組成 (濃度は酵素溶液添加後の反応系の最終濃度)

60.0 mM Tris-塩酸緩衝液 (pH 8.6)

13.0 mM 塩化マグネシウム

90.0 mM 塩化カリウム

1.0 mM DTT

各 0.25 mM dATP、dCTP、dGTP、dTTP

各 3.0 mM ATP、CTP、UTP、GTP

2.8、3.2、3.6、4.0、4.4 mM の ITP

1.0 μ M 第1のオリゴヌクレオチド (配列番号1)

1.0 μ M 第2のオリゴヌクレオチド (配列番号9; 該配列中の5' 端1番目の「A」から28番目の「A」までの部分はT7ポリメラーズのプロモータ配列として付加した配列である。)

0.16 μ M の切断用オリゴヌクレオチド (配列番号10; 標的RNAを特定配列の5'末端で切断するためのオリゴヌクレオチド、特定配列の5'末端に重複して隣接する領域に対して相補的な配列を有し、標的RNAとRNA-DNA 2本鎖を形成した後、逆転写酵素のRNase H活性によりRNA-DNA 2本鎖のRNAを切断するためのオリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドプライマーとして機能しないように3'末端

はアミノ化処理されている)

25.0 nMのインターカラー性蛍光色素(図1)で標識されたオリゴヌクレオチドプローブ(YO-271)(配列番号3;3'末端はグリコール酸で修飾されている)

39ユニット リボヌクレエース インヒビター(宝酒造(株)製)

15.0% DMSO

容量調製用蒸留水

(3) 上記の反応液を、41℃で5分間保温後、以下の組成で、かつ、予め41℃で2分間保温した酵素液4.2 µlを添加した。

酵素液の組成(反応時の最終濃度)

1.7% ソルビトール

8ユニット AMV逆転写酵素(宝酒造(株)製)

142ユニット T7 RNAポリメラーズ(GIBCO社製)

3 µg 牛血清アルブミン

容量調製用蒸留水

(4) 引き続きPCRチューブを直接測定可能な温調機能付き蛍光分光光度計を用い、41℃に保温して、励起波長470 nm、蛍光波長510 nmで、反応溶液の蛍光強度を経時的に測定した。

酵素添加時の時刻を0分として、サンプルの蛍光強度比(所定時刻の蛍光強度値÷バックグラウンドの蛍光強度値)の経時変化を図7に示した。また、蛍光強度比が1.2を超えた時間を立上り時間とし、立上り時間とITP濃度との関係を図8に示した。

図7、図8より、立上り時間が最も早くなるITPの最終濃度は3.2 mMから4.4 mMに最適値があることが示された。このように、好適な条件では、ITPを添加することによって、 10^5 コピー/テストのRNAが17分で検出され、高効率な増幅系の構築ができたことが示された。

陰性（N e g a）のときには蛍光強度の増加が見られていないことから、特定塩基配列の R N A を検出していることが示された。

産業上の利用可能性

以上の説明から明らかなように、本発明によれば、試料中の特定塩基配列を含む 1 本鎖 R N A について、反応液を急激に昇温・降温するという操作を繰り返すことなく、概ね一定温度で、反応開始時に行う 1 段階の手動操作のみで、かつ、迅速に試料中に元来存在した特定 R N A 配列を増幅する方法において、ITP を添加することによって増幅効率を飛躍的に向上させることが可能となる。

また、本発明では、試料中の標的 R N A をもとにして、D N A 依存性 R N A ポリメラーゼのプロモーター領域を末端にもつ 2 本鎖 D N A が合成され、これが多量の 1 本鎖 R N A の合成源になり、さらに合成された 1 本鎖 R N A 量は飛躍的に増大し、インターカラーター性蛍光色素で標識されたプローブが、生成した 1 本鎖 R N A と相補結合することによる蛍光増加を測定する工程において、蛍光強度が増加する過程を解析することにより、簡便かつ、迅速に初期 R N A 量を決定する方法を提供することができる。

請求の範囲

1. 特定塩基配列を含む試料中の標的RNAを鋳型として、プロモーター配列を有し前記特定塩基配列又は前記特定塩基配列と相補的な配列からなるRNAを転写可能な2本鎖DNAを生成し、RNAポリメラーゼによって前記特定塩基配列又は前記特定塩基配列に相補的な配列からなるRNA転写産物を生成し、更に、該RNA転写産物を鋳型として前記2本鎖DNAを生成する工程からなるRNA増幅工程において、RNAポリメラーゼの基質としてアデノシン三リン酸、ウリジン三リン酸、シチジン三リン酸、グアノシン三リン酸に加え、イノシン三リン酸を添加する、前記標的RNAの増幅方法。
2. 前記増幅工程において、RNAポリメラーゼとしてファージSP6のRNAポリメラーゼを用い、イノシン三リン酸を終濃度が0.5 mM～2 mMの範囲となるように添加することを特徴とする、請求項1に記載の増幅方法。
3. 添加するイノシン三リン酸の終濃度と、それ以外のリボヌクレオシド三リン酸（アデノシン三リン酸、ウリジン三リン酸、シチジン三リン酸及びグアノシン三リン酸）の終濃度の比率が0.5対1.0～1.5対1.0の範囲であることを特徴とする請求項2に記載の増幅方法。
4. 前記増幅工程において、少なくとも、トリス塩酸緩衝液（pH8.5～8.9）の終濃度が20 mM～50 mM、塩化マグネシウムの終濃度が12 mM～20 mM、リボヌクレオシド三リン酸（アデノシン三リン酸、ウリジン三リン酸、シチジン三リン酸及びグアノシン三リン酸）の終濃度が3.5 mM～5.0 mM、RNAポリメラーゼとしてファージT7のRNAポリメラーゼを含み、イノシン三リン酸を終濃度が1.0 mM～2.7 mMの範囲となるように添加することを特徴とする、請求項1に記載の増幅方法。
5. 添加するイノシン三リン酸の終濃度と、それ以外のリボヌクレオシド

三リン酸（アデノシン三リン酸、ウリジン三リン酸、シチジン三リン酸及びグアノシン三リン酸）の終濃度の比率が0.3対1.0～0.7対1.0の範囲であることを特徴とする請求項4に記載の増幅方法。

6. 前記増幅工程において、少なくとも、トリス塩酸緩衝液（pH8.5～8.9）の終濃度が50 mM～80 mM、塩化マグネシウムの終濃度が12 mM～20 mM、リボヌクレオシド三リン酸（アデノシン三リン酸、ウリジン三リン酸、シチジン三リン酸及びグアノシン三リン酸）の終濃度が2 mM～3.5 mM、RNAポリメラーゼとしてファージT7のRNAポリメラーゼを含み、イノシン三リン酸を終濃度が3.2 mM～4.4 mMの範囲となるように添加することを特徴とする、請求項1に記載の増幅方法。

7. 添加するイノシン三リン酸の終濃度と、それ以外のリボヌクレオシド三リン酸（アデノシン三リン酸、ウリジン三リン酸、シチジン三リン酸及びグアノシン三リン酸）の終濃度の比率が1.0対1.0～1.0対1.5の範囲であることを特徴とする請求項6に記載の増幅方法。

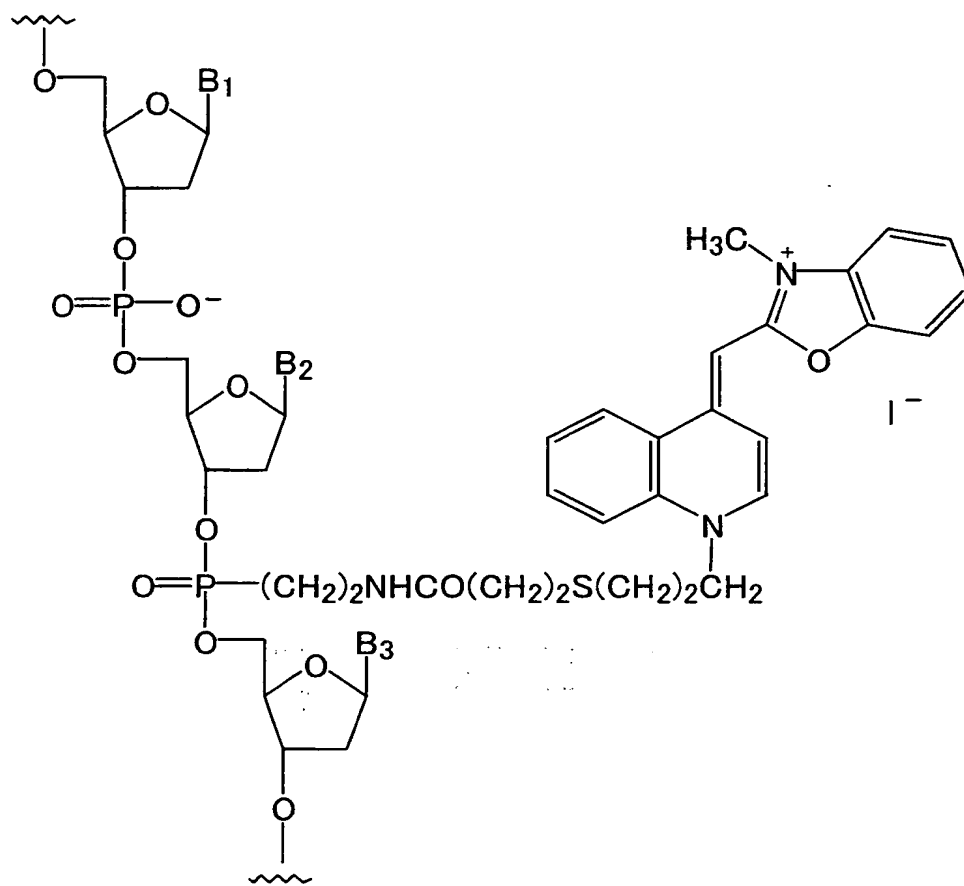
8. 前記RNA増幅工程は、特定塩基配列に相補的な配列を有するプライマー及び特定塩基配列に相同的な配列を有するプライマー（ここで一方のプライマーは、5'側にRNAポリメラーゼのプロモーター配列を有するプロモータープライマーである）を用い、標的RNAを鋳型としてRNA依存性DNAポリメラーゼにより1本鎖DNAを生成し、該1本鎖DNAを鋳型としてDNA依存性DNAポリメラーゼを用いることで、特定塩基配列又は特定塩基配列に相補的な配列からなるRNAを転写可能なプロモーター配列を有する2本鎖DNAを生成すること、そして、該2本鎖DNAがRNAポリメラーゼ存在下でRNA転写産物を生成し、該RNA転写産物が引き続き前記RNA依存性DNAポリメラーゼによる1本鎖DNA生成の鋳型となるものであることを特徴とする、請求項1に記載の増幅方法。

9. 請求項1に記載の増幅工程をインターカレーター性蛍光色素で標識されたプローブの存在下で実施し、反応液の蛍光強度を経時的に測定することからなる、標的核酸の分析方法。

10. 前記インターカレーター性蛍光色素で標識されたプローブが、RNA転写産物との相補結合によって、複合体を形成していない場合と比較して蛍光特性が変化するものであることを特徴とする、請求項9に記載の分析方法。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 1



THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 2

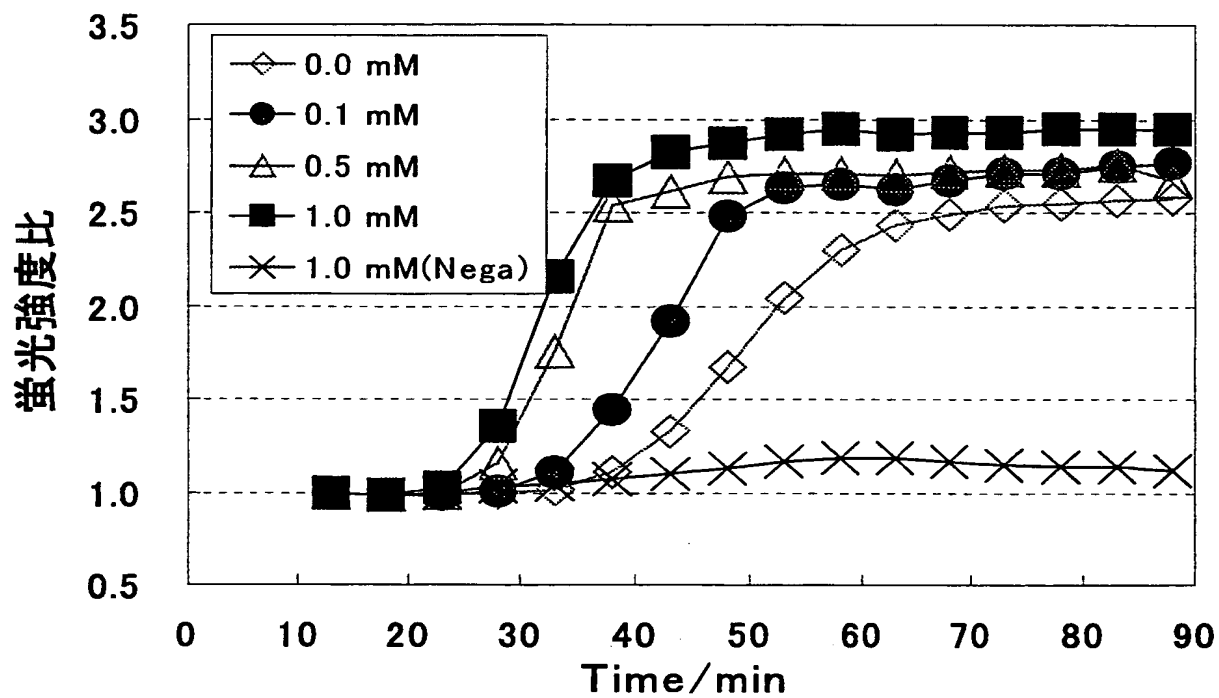
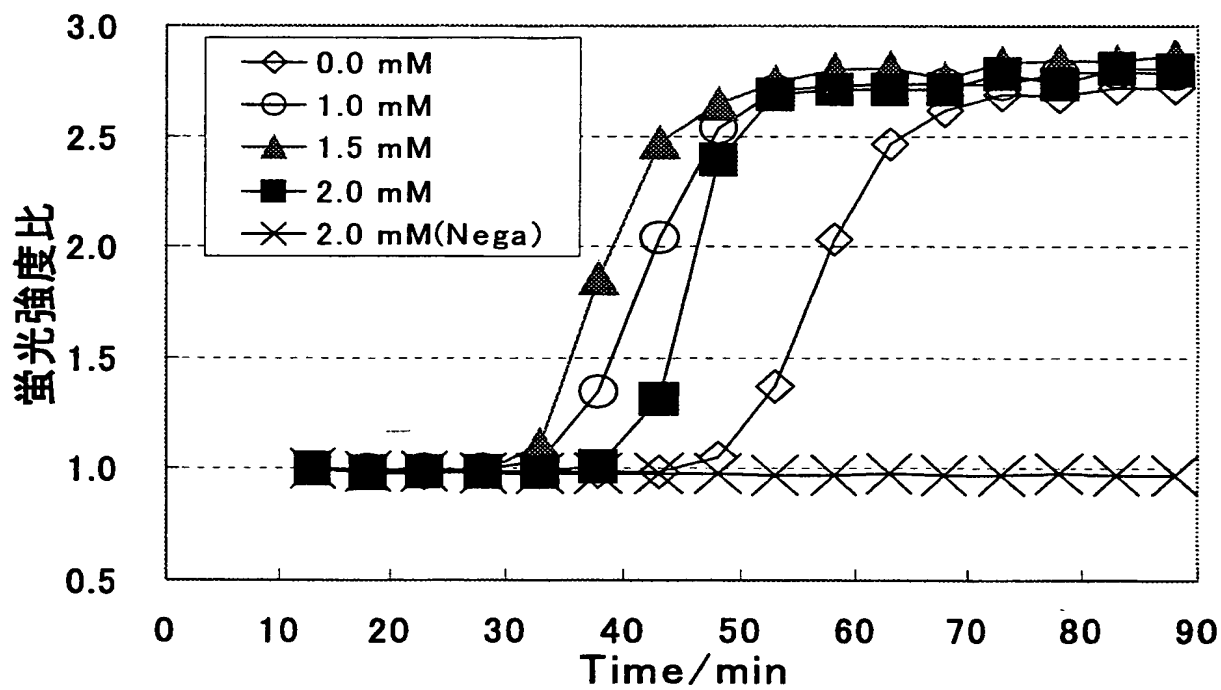


図 3



THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 4

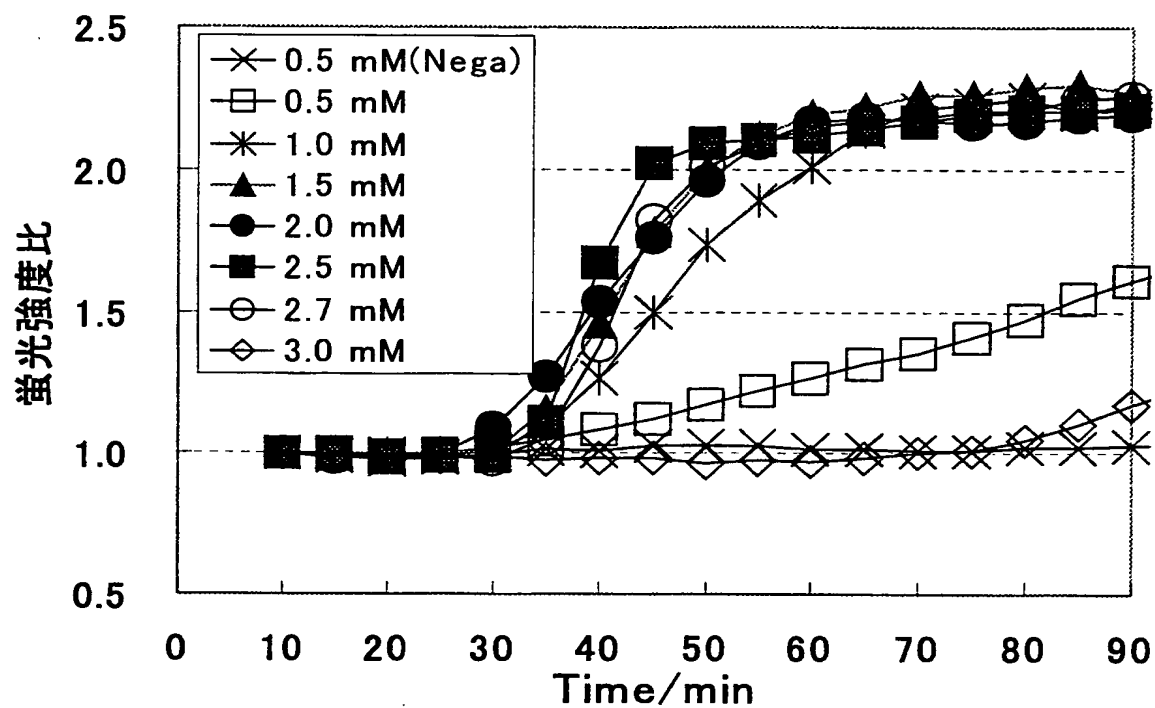
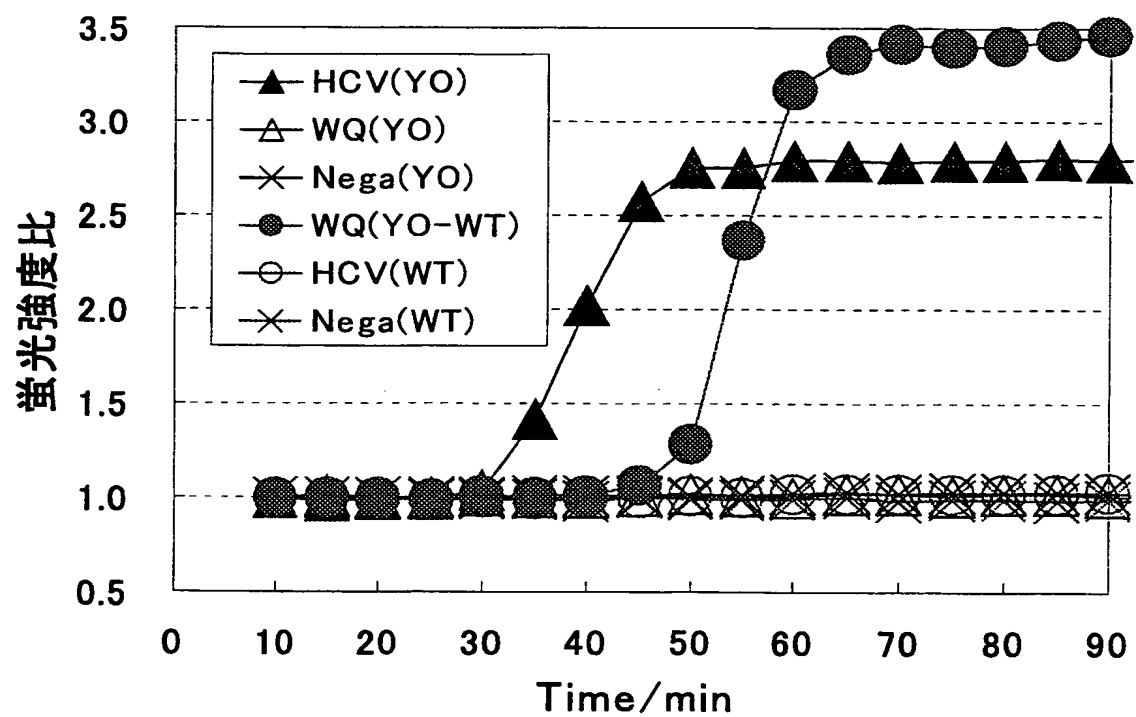
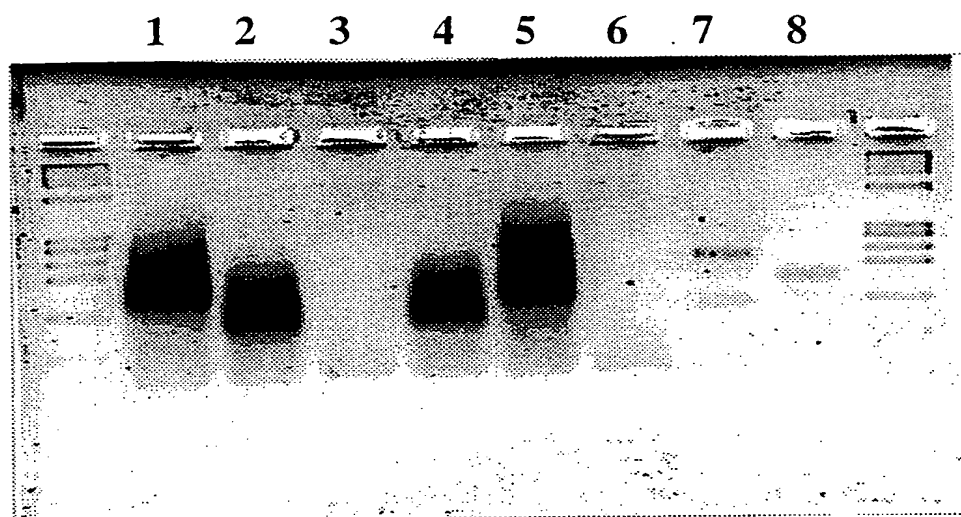


図 5



THIS PAGE BLANK (USPTO)

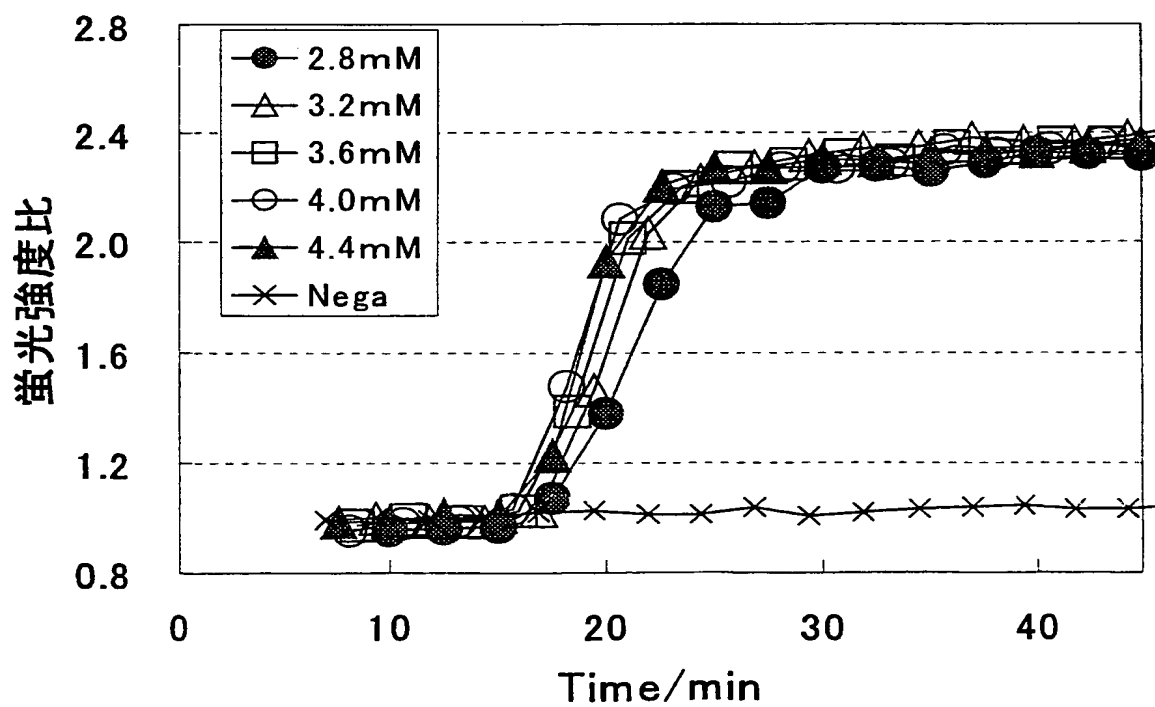
図6



1. HCV(YO-271)
3. Nega(YO-271)
5. HCV(YO-WT)
7. HCV(155bp)

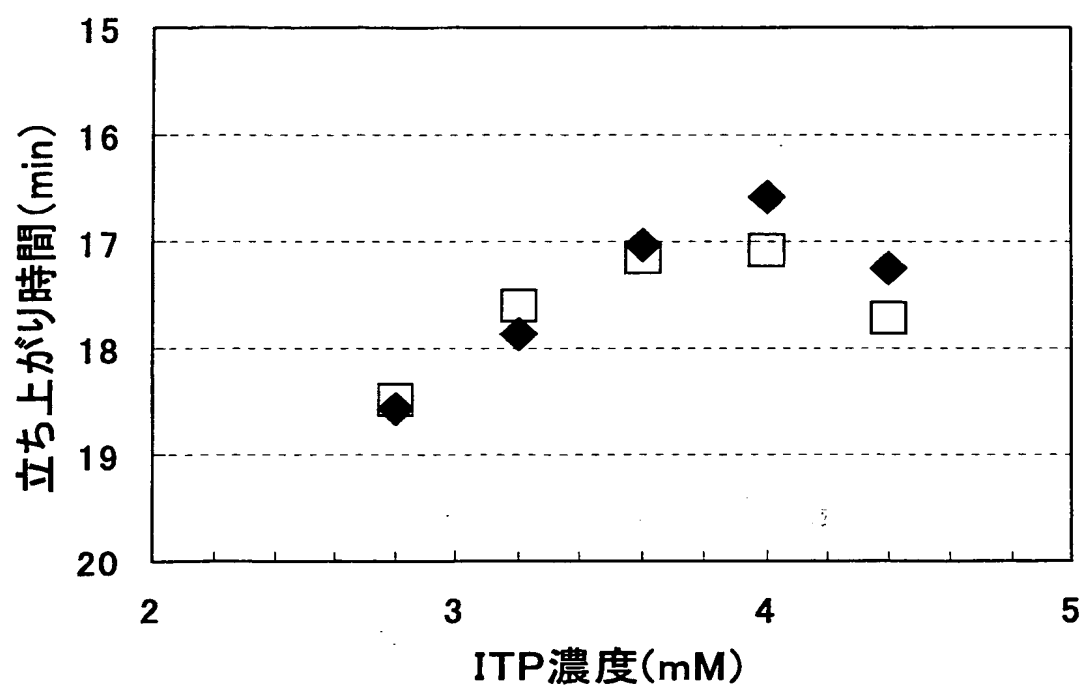
2. WQ(YO-271)
4. WQ(YO-WT)
6. Nega(YO-WT)
8. WQ(102bp)

図7



THIS PAGE BLANK (USPTO)

図8



THIS PAGE BLANK (USPTO)

配列表

SEQUENCE LISTING

<110> Tosoh Corporation

<120> 増強された核酸増幅法

<130> PA211-

<160> 10

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 第1のオリゴヌクレオチド

THIS PAGE BLANK (USPTO,

<400> 1

gccttttcgcg acccaaca

18

<210> 2

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 第2のオリゴヌクレオチド

<400> 2

atttaggtga cactatagaa tacaacctcc cgggagagcc atagtgggtct

50

<210> 3

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<220>

<223> 第 3 のオリゴヌクレオチド

<400> 3

ctcgcggggg ctg

13

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 第 1 のオリゴヌクレオチド

<400> 4

cctcccggga gagccatagt ggtc

24

<210> 5

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 第 2 のオリゴヌクレオチド

<400> 5

aattctaata cgactcacta tagggagagc ctttcgcgac ccaacact

48

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 第 3 のオリゴヌクレオチド

<400> 6

THIS PAGE BLANK (USPTO)

gtgccccgc gagactgcta

20

<210> 7

<211> 102

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ヒトC型肝炎ウイルス合成RNA (WQ-RNA)

<400> 7

gaauacaacc ucccgggaga gccauagugg ucugcgacug ucaucuaucu acacugucca 60

cuggaugcac ucuaucuccau ucaguguugg gucgcgaaag gc 102

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<220>

<223> 第 4 のオリゴヌクレオチド

<400> 8

gaatgggata gagtgcattcc agtg

24

<210> 9

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 第 2 のオリゴヌクレオチド

<400> 9

aattctaata cgactcacta tagggagacc tcccgggaga gccatagtgg tct

53

<210> 10

<211> 50

<212> DNA

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 切断用オリゴヌクレオチド

<400> 10

ccgggagggg gggtcctgga ggctgcacaa cactcatact aacgccatgg

50

THIS PAGE BLANK (USPTO

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03647

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12Q1/68, C12N15/09, G01N33/542, G01N33/566

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12Q1/68, C12N15/09, G01N33/542, G01N33/56

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 5-276946, A (TOSOH CORPORATION), 26 October, 1993 (26.10.93) (Family: none)	1-10
A	JP, 5-237000, A (TOSOH CORPORATION), 17 September, 1993 (17.09.93), & EP 487218, A	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
29 August, 2000 (29.08.00)

Date of mailing of the international search report
19 September, 2000 (19.09.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl' C12Q1/68, C12N15/09, G01N33/542, G01N33/566			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl' C12Q1/68, C12N15/09, G01N33/542, G01N33/56			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
A	JP, 5-276946, A (東ソー株式会社) 26. 10月. 1993 (26. 10. 93) ファミリーなし	1-10	
A	JP, 5-237000, A (東ソー株式会社) 17. 9月. 1993 (17. 09. 93) & EP 487218, A	1-10	
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 29. 08. 00		国際調査報告の発送日 19. 09. 00	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 加藤 浩 印 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

THIS PAGE BLANK (USPTO)